

München. 1960

**Die quantitative Bestimmung
freier Aminosäuren
des Blutplasmas mit Hilfe
eines papierchromatographischen
Verfahrens**

Peter Dieterle

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

**Die quantitative Bestimmung
freier Aminosäuren
des Blutplasmas mit Hilfe
eines papierchromatographischen
Verfahrens**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Dieterle

aus Leisnig / Sachsen

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. ZICKGRAF
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan: Prof. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1960



MEINEN ELTERN GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554012_0083

INHALTSÜBERSICHT

I. EINLEITUNG

II. METHODIK

III. PRAKTISCHER TEIL

- A. Versuche mit Einzelamino-säuren
- B. Versuche mit Aminosäuregemischen
- C. Versuche mit anderen Verfahren
- D. Vorversuche zur Bestimmung der bei elektrolytischer Entsalzung salzhaltiger Aminosäurelösungen entstehenden Verluste.
- E. Bestimmung der Plasmaamino-säuren

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

VII. LEBENSLAUF

Die bisher in der Literatur mitgeteilten quantitativen Angaben über die freien Aminosäuren des Blutplasmas bei Normalen stimmen hinsichtlich des Gesamtaminostickstoffes ganz gut überein (13, 36), schwanken jedoch beträchtlich, wenn man die Werte für die verschiedenen Einzelaminosäuren miteinander vergleicht (3, 4, 14, 16 - 20, 25, 29, 32 - 34, 36, 40). Dies mag zum Teil durch die verschiedene Methodik bedingt sein, mit der diese Werte gewonnen wurden. Doch auch bei ähnlichem methodischen Vorgehen kommen verschiedene Autoren oft zu recht unterschiedlichen Angaben. Daher haben wir uns bemüht, mit Hilfe eines quantitativen Verfahrens erneut die freien Aminosäuren des Blutplasmas bei normalen gesunden Versuchspersonen zu bestimmen. Damit sollte eine Basis für spätere Untersuchungen an pathologischen Fällen gewonnen werden.

An dieses Verfahren waren drei Bedingungen geknüpft. Erstens sollten die Bestimmungen bei tragbarem Zeitaufwand genügend genau sein. Zweitens sollten möglichst alle der im Blutplasma vorkommenden Aminosäuren gleichzeitig bestimmt werden, und drittens mußte das Verfahren mit den vorhandenen und in jeder Klinik beschaffbaren einfachen Hilfsmitteln durchzuführen sein. Diese letzte Bedingung schloß die zwar sehr genaue, aber mit größerem Aufwand verbundene Austauscherschromatographie nach MOORE und STEIN (27, 28) aus. Wir konnten nur ein papierchromatographisches Verfahren in Betracht ziehen und entschieden uns für die Methode von FISCHER und DÖRFEL (8). Diese Methode lieferte uns nach umfangreichen Vorversuchen mit einer Reihe anderer Verfahren als einzige genügend genaue und reproduzierbare Ergebnisse.

Das eindimensionale Verfahren gestattet durch gleichzeitiges Auftragen von Testgemischen bekannter Zusammensetzung etwaige Verluste oder Fehlermöglichkeiten während der Chromatographie dadurch zu kompensieren, daß alle erhaltenen Werte auf die bekannte Testmischung bezogen werden. Die mit großem Arbeitsaufwand verbundene Elution der in einzelne Banden getrennten Aminosäuren und die Kolorimetrie der Eluate kann dadurch umgangen werden, daß man nach dem Vorgehen von GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL (9), sowie von STROBEL (37) die mit Ninhydrin gefärbten Streifen transparent macht und die Extinktionswerte der Banden direkt auf dem Papier mit einem automatisch registrierenden Gerät ausmißt. Diese wesentliche Vereinfachung bei mindestens gleich großer Genauigkeit macht das Verfahren von FISCHER und DÖRFEL auch für den vielbeschäftigten Kliniker geeignet und erlaubt größere Reihenuntersuchungen durchzuführen. Ein Auswertegerät steht heute wohl in jeder größeren Klinik zur Auswertung der Eiweiß-Elektrophoresestreifen zur Verfügung.

Die Verwendung mehrerer Lösungsmittel bei der Papierchromatographie ermöglicht die getrennte Bestimmung fast aller Plasmaamino-säuren. Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, unsere Erfahrungen mit diesem Verfahren bei der Auftrennung der Blutamino-säuren mitzuteilen und die an normalen gesunden Versuchspersonen gewonnenen Werte mit den bisherigen Angaben anderer Autoren zu vergleichen.

M E T H O D I K

Aufarbeitung des Blutes: 20 ml Cubitalvenenblut werden in einem mit Thrombocid benetzten Glasgefäß aufgefangen. Die Erythrozyten werden sofort vom Plasma abzentrifugiert und dieses mit dem vierfachen Volumen Azeton versetzt. Der Eiweißniederschlag wird abzentrifugiert, mit Azeton noch einmal aufgerührt und erneut abzentrifugiert. Beide Zentrifugate werden vereinigt und im Vakuum wird das Azeton abdestilliert. Die verbleibende Lösung wird mit Aqua dest. auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und zur Entfernung der Lipoide mehrmals mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt (20). Hierbei treten, wie Kontrollversuche mit reinen Aminosäurelösungen ergeben haben, keine nachweisbaren Aminosäureverluste ein. Sodann wird nach CONSDEN, GORDON und MARTIN (5) elektrolytisch entsalzt. Dazu verwenden wir die von KNAUFF, MIALKOWSKY und ZICKGRAF (23) beschriebene, mit einem Kühlmantel versehene Entsalzungsapparatur nach ASTRUP (1). Die Entsalzungszeit beträgt gewöhnlich 40 Minuten, da die Entsalzung möglichst vollständig sein muß. Die entsalzte Lösung wird im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der schwach gelblich gefärbte, kristalline Rückstand mit $1/25$ des ursprünglichen Volumens $n/10$ HCl aufgenommen. Diese Lösung wird unmittelbar zur Chromatographie verwandt.

Papierchromatographie: Ein Filterbogen Schleicher und Schüll 2043 b, Format 40 mal 19 cm, wird in Laufrichtung in vier parallele Streifen von je 4 cm Breite unterteilt, die durch Ausschnitte von 1 cm Breite getrennt sind und am unteren und oberen Rand durch eine 2 - 4 cm breite Brücke zusammenhängen. 4 cm vom unteren Rand der Streifen werden die zu untersuchenden Lösungen gleichmäßig aufgetragen (Vgl. Abb. 1).

Auf Streifen 1 kommt eine Mischung genau eingewogener Testamino-säuren, auf Streifen 2 werden 0,04 ml der zu untersuchenden Lösung (entsprechend 1 ml Blutplasma) aufgetragen, Streifen 3 dient zur Aufnahme einer zweiten konzentrierteren Testmischung. Streifen 4 steht für Parallelversuche mit dem gleichen Plasma oder für weiteres Untersuchungsgut zur Verfügung. Die zu bestimmenden Lösungen werden so zwischen zwei bekannten Aminosäurelösungen verschiedener Konzentration chromatographiert. Die Chromatographie geschieht aufsteigend mit einem der folgenden Entwicklungsgemische:

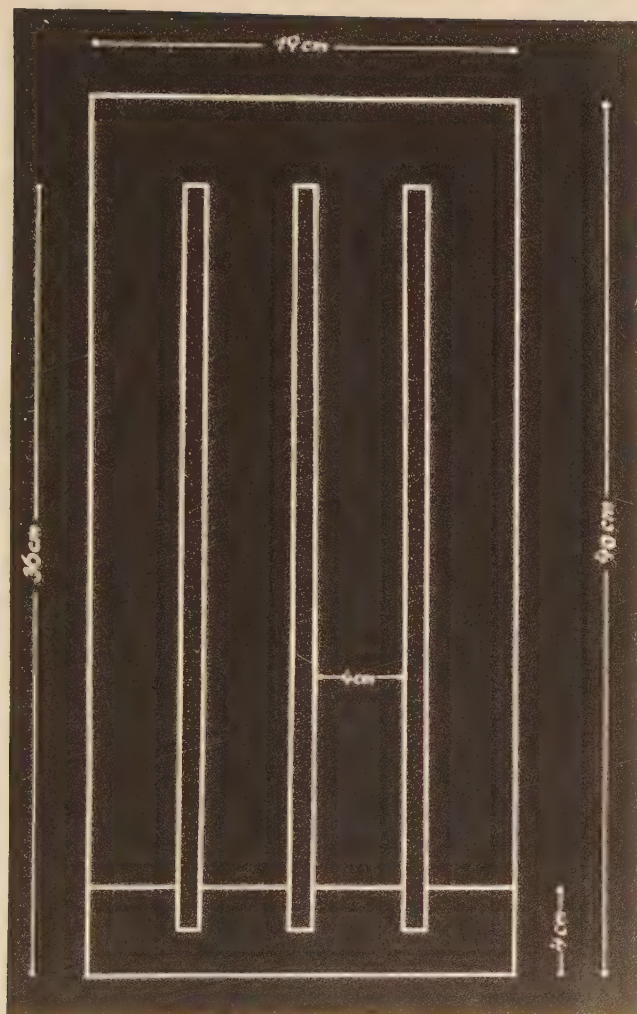


Abbildung 1:

Filterbogen, durch mehrere parallele Streifen unterteilt, zur vergleichenden Chromatographie von bekannten Testlösungen mit einer unbekannten Lösung. Der waagerechte Strich markiert die Auftragslinie.

Butanol, Eisessig, Wasser = 4 : 1 : 5

Methyläthylketon, Pyridin, Wasser = 7 : 1, 5 : 1,5 und

Isopropylalkohol, Eisessig, Wasser = 7 : 1, 5 : 1,5.

Nach 24 Stunden ist mit keinem dieser Gemische eine ausreichende Trennung der Plasmaamino-säuren zu erzielen. Wir trocknen daher nach dieser Zeit die Chromatogramme und entwickeln sie im selben Gemisch für weitere 24 Stunden. Meist wiederholen wir diesen Vorgang noch ein drittes Mal. Dieses Verfahren bewährt sich vor allem zur Trennung der langsam laufenden Aminosäuren. Ein ununterbrochenes Entwickeln über 72 Stunden liefert dagegen ziemlich verwaschene Banden, die sich nur schlecht auswerten lassen.

Nach dem Entwickeln werden d. Chromatogramme bei 30°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend mit Ninhydrin (0,5 gr Ninhydrin in 100 ml Azeton, 5 ml Aqua dest. und 5 ml Eisessig) gefärbt. Wir ziehen die noch nicht in einzelnen Streifen zerschnittenen, ganzen Bögen gleichmäßig durch die Farblösung (beim Besprayen werden die Färbungen weniger einheitlich) und entwickeln sie dann 15 Minuten bei 80°C. Erst dann werden die einzelnen Streifen vom Bogen getrennt, mit Transparenzöl (Brom-Naphthalin und Paraffinöl zu gleichen Teilen) im Vakuum transparent gemacht und unmittelbar danach photometriert. Dazu benutzten wir in einigen Versuchen den Zeiss-Extinktionsschreiber II, in anderen den Elphor-Integraphen der Firma Bender und Hobein München. Die erhaltenen Extinktionskurven wurden in üblicher Weise ausplanimetriert.

E R G E B N I S S E

A. Versuche mit Einzelamino-säuren:

Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurden sämtliche Teilschritte unserer Methodik einer genauen Prüfung hinsichtlich ihrer Fehlerbreite unterzogen. Dazu wurden zunächst eingewogene Mengen reiner Aminosäuren in Aqua dest. gelöst und dann strichförmig auf den beschriebenen, in einzelne Streifen unterteilten Bögen, in steigender Konzentration von 0,025 bis 0,5 Mikromol/Aminosäure aufgetragen. Nach der Chromatographie wurden die Streifen in der oben geschilderte Weise ausgewertet. Die Planimeterwerte steigen entsprechend den aufgetragenen Aminosäuremengen im Bereich von 0,025 Mikromol bis 0,5 Mikromol in Abhängigkeit zur Konzentration linear an. Im Bereich oberhalb der angegebenen Konzentration wird diese strenge Linearität nicht mehr gewahrt. Unterhalb dieser Konzentration werden die Werte zunehmend ungenauer. Es empfiehlt sich daher, etwa in diesem Bereich zu arbeiten. Abbildung 2 zeigt drei Eichkurven, wie sie für Alanin, Threonin und Tyrosin erhalten wurden. Ähnliche Eichkurven wurden für alle anderen Aminosäuren gewonnen. Die unterschiedlichen Neigungswinkel der

einzelnen Geraden sind durch die unterschiedliche Ninhydrinfärbbarkeit der einzelnen Aminosäuren bedingt. Man erhält daher für jede Aminosäure eine eigene Eichkurve. Der Extinktionswert einer bestimmten Aminosäure ist nur mit anderen Extinktionswerten der gleichen Aminosäure vergleichbar.

Die Streubreite, die für jede einzelne Aminosäure in mindestens fünf Einzelbestimmungen errechnet wurde, schwankt etwas zwischen den verschiedenen Aminosäuren. Bei den sich mit Ninhydrin weniger gut anfärbenden Säuren Tyrosin, Phenylalanin und Cystin beträgt sie etwa $\pm 6\%$, bei den gut färbbaren Säuren Threonin, Glutamin und Alanin dagegen nur $\pm 3\%$ bzw. $\pm 3,5\%$. Im Durchschnitt kann mit einer Streuung von $\pm 4\%$ gerechnet werden.

Nach einem Vorschlag von BODE (2) versuchten wir die Schwankungen der Ninhydrinfärbungen zwischen den einzelnen Aminosäuren dadurch zu verkleinern, daß wir die mit Ninhydrin gefärbten Chromatogramme vor der Extinktionsmessung mit Kupfersalzen besprühten und so die Aminosäuren in ihre Kupferkomplexe überführten. Dadurch erreicht man für alle Aminosäuren eine etwa gleiche Farbtönung und ähnliche Farbintensitäten. Trotz Messungen mit Filtern verschiedener Wellenlänge erzielten wir mit diesem modifizierten Verfahren etwas schlechtere Ergebnisse und gaben es daher wieder auf.

B. Versuche mit Aminosäuregemischen:

Wir trugen zunächst nur wenige (bis zu acht) Aminosäuren enthaltende Gemische auf, bei denen wir die sichere Gewähr hatten, daß alle im Gemisch befindlichen Säuren sich noch sicher trennen lassen. Die mit steigenden Mengen solcher Gemische erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich in keiner Weise von denen, die mit Einzelaminosäuren erhalten wurden. Die Eichkurven und die jeweiligen Streubreiten waren die gleichen. Bei Parallelversuchen mit demselben Gemisch in gleicher Konzentration betrug die Streubreite durchschnittlich $\pm 4\%$ (3 Einzelversuche). Darauf stellten wir Gemische zusammen, die bis zu 21 Aminosäuren enthielten und damit etwa den komplexen Verhältnissen in biologischen Flüssigkeiten entsprachen. Mit keinem der von uns verwendeten Entwicklungsgemische gelang uns jetzt bei eindimensionaler Chromatographie eine völlige Auftrennung sämtlicher Aminosäuren, auch nicht, wenn wir die Chromatogramme nach 24 und 48 Stunden trockneten und dann erneut chromatographierten. Bei der Verwendung der 21 Aminosäuren Alanin, Alpha-Amino-n-Buttersäure, Arginin, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin erhielten wir in den oben angegebenen Lösungsmitteln immer 11 bis 14 Banden, von denen einige durch eine einzelne Aminosäure, andere durch zwei oder mehrere Aminosäuren mit ähnlichem Rf-Wert gebildet werden.

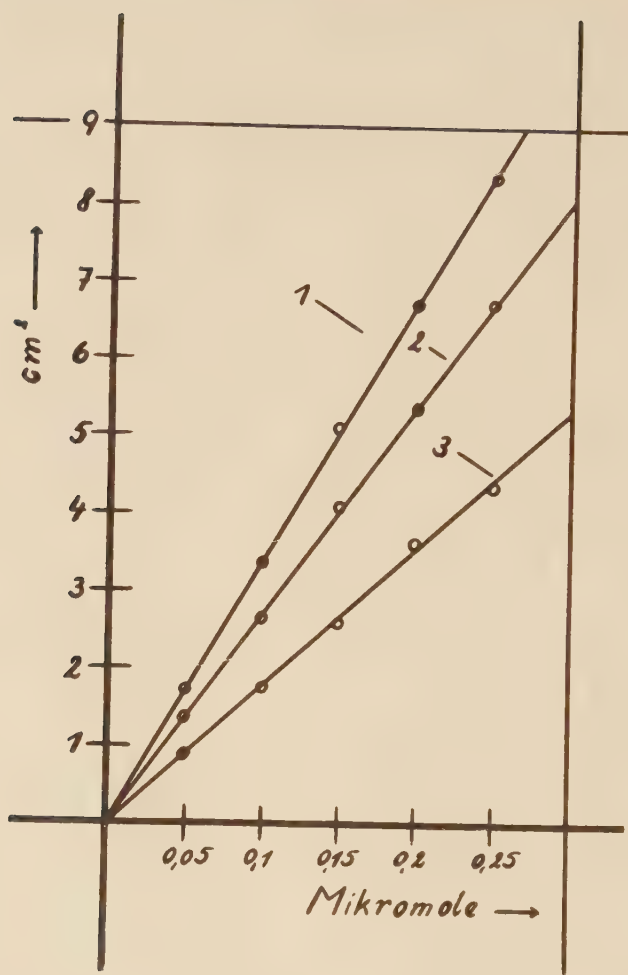


Abbildung 2:

Lineare Abhängigkeit der Planimeterwerte
von der Konzentration der Aminosäuren.

1 = Alanin

2 = Threonin

3 = Tyrosin

Tabelle 1 zeigt, welche Aminosäuren in den drei verschiedenen Entwicklungsgemischen einzeln bestimmt werden können.

Verwendet man alle drei dieser Lösungsmittelsysteme in Parallelversuchen nebeneinander, so gelingt es 17 der 21 Aminosäuren in wenigstens einem Lösungsmittelgemisch von allen anderen abzutrennen und getrennt zu bestimmen. Die Fehlerbreite für die Berechnung dieser 17 Aminosäuren ist dann nicht größer als bei Versuchen, bei denen nur eine einzelne Aminosäure aufgetragen und chromatographiert wurde. Die Aminosäuren Arginin, Lysin, Methionin und Threonin lassen sich dagegen in keinem der von uns verwendeten Lösungsmittelsysteme von allen übrigen abtrennen. Aus Tabelle 1 ist jedoch ersichtlich, daß diese Aminosäuren auf mindestens einem der in den verschiedenen Lösungsmitteln gewonnenen Chromatogramme mit Aminosäuren kombiniert sind, die sich ihrerseits in einem anderen Entwicklungsgemisch getrennt bestimmen lassen. Will man daher sämtliche Aminosäuren des Gemisches einzeln bestimmen, muß man dasselbe Aminosäuregemisch in den drei verschiedenen Lösungsmitteln chromatographieren. Dann werden die Mengen der einzeln bestimmbar Aminosäuren berechnet. Bildet nun eine in einem der Lösungsmittel vorher einzeln bestimmte Aminosäure in einem anderen Lösungsmittel mit einer nicht einzeln bestimmbar Aminosäure eine gemeinsame Bande, so kann vom Extinktionswert dieser Bande der bekannte Extinktionswert der schon bestimmten Aminosäure abgezogen und der verbleibende Rest auf die anderweitig nicht einzeln bestimmbar Aminosäure bezogen werden. Die Fehlerbreite für die Bestimmung dieser sonst nicht trennbaren Aminosäuren steigt dadurch nur um ein Geringes.

C. Versuche mit anderen Verfahren:

Gute qualitative Resultate, nämlich gute Auftrennung der einzelnen Aminosäuren, erzielten wir durch vorausgehende Hochspannungselektrophorese oder Papierchromatographie in einem anderen Lösungsmittel. Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten, eluiert und erneut zur Chromatographie aufgetragen. DOSE und CAPUTO (6, 7) empfehlen diese Methode sehr. Wir gaben jedoch dieses Verfahren wieder auf, da die Fehlerbreite höher als bei der von uns geschilderten Methode war. Dafür dürften in erster Linie die geringen Aminosäuremengen verantwortlich sein, die für eine Bestimmung zur Verfügung standen.

Wir versuchten ferner die Hochspannungselektrophorese allein zur Auftrennung der Aminosäuren zu benutzen, und die Elektrophoresestreifen ähnlich dem oben beschriebenen Vorgehen durch ein direkt schreibendes Extinktionsmeßgerät auszuwerten. Ein solches Verfahren wurde von GRASSMANN, HANNIG und KNEDEL (10), von TURBA (38) und von HEILMEYER und Mitarbeitern (15) kurz erwähnt, und jüngst wieder von RÖWE, FERBER und FISCHER (30) zur Diskussion gestellt. Auch dieses an sich einfache Verfahren geben wir wieder auf, da die Fehlerbreite ziemlich hoch lag.

TABELLE 1

Anordnung von 21 freien Plasma-Aminosäuren, getrennt in einzelne Banden (1 - 14) nach aufsteigender Papierchromatographie in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen.

A = Butanol, Eisessig, Wasser 4 : 1 : 5;

B = Isopropylalkohol, Eisessig, Wasser 7 : 1,5 : 1,5;

C = Methyläthylketon, Pyridin, Wasser 7 : 1,5 : 1,5.

Bande	A	B	C
1	Cystin	Cystin	Cystin Lysin Arginin Ornithin
2	Lysin Ornithin	Ornithin	Glutaminsäure
3	Histidin	Histidin Lysin Arginin	Histidin Glutamin
4	Arginin Glutamin Taurin	Glutamin	Glykokoll
5	Serin Glykokoll	Taurin Serin Glykokoll	Serin
6	Glutaminsäure Threonin	Glutaminsäure Threonin	Threonin Alanin
7	Alanin	Methionin Tryptophan	Prolin
8	Prolin	Alanin	a-ABS
9	a-ABS	Tyrosin Prolin	Taurin
10	Tyrosin	a-ABS	Valin
11	Valin Methionin	Phenylalanin	Methionin Tyrosin Tryptophan
12	Tryptophan	Valin	Isoleucin
13	Phenylalanin Isoleucin	Isoleucin Leucin	Phenylalanin Leucin
14	Leucin		

Einen Hauptgrund dafür sahen wir in der Notwendigkeit, die Analysenlösung auf feuchtes Papier auftragen zu müssen. Man kann daher, sofern man nicht undeutliche, verwaschene Banden in Kauf nehmen will, nur sehr geringe Flüssigkeitsmengen und damit entsprechend weniger gelöste Substanz auf die gleiche Streifenbreite auftragen. Die einzelnen Aminosäurebanden sind daher nachher weniger intensiv gefärbt und bringen eine höhere Fehlergrenze bei der Auswertung mit sich.

Um auch größere Mengen auswerten zu können, trugen wir Aminosäuregemische auf trockenem Filtrierpapier auf. Das ist deshalb von Vorteil, weil auf trockenem Papier die Diffusionsgeschwindigkeit der Flüssigkeit kleiner ist, und man die Ausbreitung außerdem durch ständiges Föhnen einschränken kann. Wir schnitten dann nur den das Aminosäuregemisch enthaltenden, etwa 2 mm langen und 4 cm breiten Streifen aus und legten ihn auf einen zur Hochspannungselektrophorese vorbereiteten Papierbogen (Schleicher und Schüll 2043 b) auf. Damit er auf dem Papierbogen gleichmäßig auflag und überall gut haftete, bespraysen wir ihn mit Pufferlösung und beschwerten ihn dann mit einem Objektträger. Die Hochspannungselektrophorese geschah unter Verwendung einer Pufferlösung aus Ameisensäure, Eisessig und Wasser (1 : 3 : 16 - pH 1,9) nach KICKHÖFEN und WESTPHAL (21) für 70 Minuten bei 4 000 V (80 V/cm) und 15 mA. Unsere Ergebnisse waren bei diesem Vorgehen jedoch sehr schlecht. Die Aminosäuren wanderten nur allmählich aus dem gut angefeuchteten Papierstreifen aus. Die Güte der Pherogramme wurde durch starke Schwanzbildung erheblich beeinträchtigt. Wir gaben deshalb auch diese Versuchsanordnung wieder auf.

Ein anderer Nachteil, der bei der Hochspannungselektrophorese in der Westphalkammer in Kauf genommen werden muß, besteht darin, daß sich der Papierbogen nicht von vorneherein durch Einschnitte in mehrere Streifen unterteilen läßt. Man muß daher die zu untersuchenden Lösungen und die Testsubstanzen nebeneinander auf demselben einheitlichen Bogen auftragen. An den Rändern der jeweiligen Auftragslinien kommt es dann leicht zu Diffusionseffekten und Zonenimperfectionen. Will man die Banden später zur Auswertung in gleicher, durch das benutzte Auswertegerät gegebener Streifenbreite ausschneiden, stellt sich häufig heraus, daß sie während der Elektrophorese durch Diffusion etwas breiter geworden sind und den Streifen überragen. Dies gilt vor allem für die am weitesten gewanderten Banden. Es bleibt dann Substanz auf dem Restbogen zurück und wird nicht mit erfaßt. Oder aber die Banden sind so schmal, daß sie den Streifen nicht gleichmäßig bedecken. Auch dies erschwert, ebenso wie alle Zonenimperfectionen die Reproduzierbarkeit der Auswertung. Schließlich können auch bei diesem Verfahren nicht alle Aminosäuren in einem Arbeitsgang voneinander getrennt werden. Man muß daher mehrere Elektropherogramme bei verschiedenem pH anfertigen und kann dann ähnlich unserem Verfahren nur die jeweils gut abgetrennten Aminosäuren auswerten. Leider sind die Trennungen jedoch nicht bei

allen Pufferlösungen gleich gut. Vor allem bei stark alkalischen Pufferlösungen erhielten wir häufig nur breite und verwaschene Banden mit erheblichen, von Bogen zu Bogen wechselnden Zonenimperfektionen, die sich dann nur schwer durch direkt schreibende Geräte auswerten lassen.

Auch die Elution von mit Ninhydrin gefärbten Aminosäureflecken aus zweidimensionalen Chromatogrammen oder Elektrophero-Chromatogrammen und die nachfolgende Kolorimetrie des Eluates bewährte sich nicht. Es bestehen auch hier einige prinzipielle Schwierigkeiten. Einmal läßt sich die tatsächliche Größe eines Fleckens nur schwer angeben, besonders wenn er von benachbarten Flecken nur schlecht getrennt ist. KOFRANYI (25) und andere haben zudem auf die großen Verluste während der Wanderung im Papier hingewiesen, die bei zweidimensionalem Vorgehen besonders groß sind. Ferner ist bei zweidimensionalem Vorgehen das Mitlaufen von Vergleichssubstanzen, auf die die Werte der unbekannten Substanzen bezogen werden können, nicht möglich. Der Vergleich mit auf anderen Bögen getrennten Testsubstanzen wird durch die Inkonsistenz der Ninhydrinfärbung erschwert, die von Bogen zu Bogen nicht sicher reproduzierbar ist. Bei zweidimensionalem Vorgehen fehlt daher die Möglichkeit, die während der Chromatographie oder Elektrophorese entstandenen Verluste in exakter Weise zu kompensieren. Dies bringt eine relativ hohe Fehlergrenze mit sich. KOFRANYI (25) kommt bei sehr sorgfältigen Untersuchungen auf 30 %.

D. Vorversuche zur Bestimmung der bei elektrolytischer Entsalzung salzhaltiger Aminosäurelösungen entstehenden Verluste:

Die Qualität der Chromatogramme hängt in hohem Maße vom Salzgehalt der chromatographierten Lösungen ab. Während mit Reinsubstanzen hervorragende Trennungen erzielt werden können, werden bei der Chromatographie nicht vorbehandelter, physiologischer Lösungen die Chromatogramme verwaschen, die einzelnen Banden schlecht getrennt und durch breite Schwanzbildungen verwischt. Das ist ein Effekt, der durch den hohen Salzgehalt der Lösungen bedingt wird. Die in hohem Überschuß vorhandenen Salze wandern mit anderer Geschwindigkeit als die Aminosäuren und reißen dabei auch einzelne Aminosäuremoleküle mit sich (39). Es ergab sich daher die Notwendigkeit, die zu chromatographierenden Lösungen vorher zu entsalzen. Dies kann nach CONSDEN, GORDON und MARTIN (5) auf elektrolytischem Wege relativ einfach bewerkstelligt werden. Wir verwendeten dazu eine Entsalzungsapparatur nach ASTRUP (1), die, mit einem Kühlmantel versehen, durch eine Kochsalz-Eis-Kältemischung gekühlt werden konnte. KNAUFF und Mitarbeiter (23) zeigten, daß bei laufender Kühlung und bei Einhaltung kurzer Entsalzungszeiten keine qualitativ feststellbaren Verluste während der elektrolytischen Entsalzung auftraten. Sie wogen eine Mischung von 39 Testamino-

und Aminen zweimal ein. Die eine Portion wurde mit Ringerlösung aufgenommen und entsalzt, während die andere Portion direkt mit Aqua dest. aufgenommen wurde. Nach der Chromatographie dieser beiden Lösungen war mit bloßem Auge kein Unterschied zwischen beiden Chromatogrammen erkennbar. Weder traten neue Flecken auf, noch verschwanden bekannte Flecken, noch unterschied sich die Intensität der Flecken in wahrnehmbarer Weise.

Bei dem hier geschilderten, quantitativen Verfahren mußten größere Ausgangsmengen entsalzt und die störenden Ionen möglichst vollständig entfernt werden. Wir mußten daher Entsalzungszeiten von etwa 40 Minuten, d. h. das 4 - 8fache der von KNAUFF angegebenen Entsalzungszeit, in Kauf nehmen. Unsere Vermutung, daß es dabei doch zu quantitativen Verlusten kommt, bestätigte sich. Um die Verluste während der Entsalzung zu bestimmen, wogen wir Aminosäuregemische ab, die in ihrer Konzentration etwa den Plasmaamino-säuren entsprachen. Diese Aminosäuregemische nahmen wir in Ringerlösung auf und entsalzten sie 40 Minuten lang. Nach der Entsalzung bestimmten wir die Verluste, indem wir die entsalzte Lösung chromatographierten und die erhaltenen Werte auf eine zweite, in ihrer Zusammensetzung ganz gleiche Aminosäuremischung, die aber nicht in Ringerlösung aufgenommen und entsalzt worden war, bezogen. Beide Chromatogramme wurden in gleicher Weise ausplanimetriert und die absoluten Aminosäuremengen berechnet. In Tabelle 2 sind die so ermittelten Verluste angegeben. In Spalte 1 finden sich die eingewogenen Mengen für die einzelnen Aminosäuren in Mikrogramm/Milliliter, in Spalte 2 die nach 40minütiger Entsalzung wiedergefundenen Mengen in Mikrogramm/Milliliter. Spalte 3 gibt den bei fünf Entsalzungsversuchen ermittelten Verlust in % an (Mittelwert) und Spalte 4 die Standardabweichung vom Mittelwert in %.

Die Verluste entsprechen etwa den bisher für die elektrolytische Entsalzung nach CONSDEN in der Literatur angegebenen Prozentzahlen (2,5). Sie fallen bei Arginin mit 36,2 % am stärksten ins Gewicht, sind jedoch auch bei Lysin, Threonin, Alpha-Amino-n-Buttersäure, Leucin, Tyrosin und Valin noch recht erheblich. Die Verlustquote ist bei Einhaltung gleicher Entsalzungszeiten und gleicher Stromstärken dieselbe.

Es lassen sich Faktoren berechnen, mit denen die gefundenen Blutaminosäurewerte korrigiert werden müssen. Die Schwankungsbreite für das Gesamtverfahren wird deshalb bei mehrmaligem Versuch mit gleichen Lösungen bei Entsalzung der Lösungen nicht höher als ohne diesen Schritt. Voraussetzung ist das Arbeiten bei stets gleichen Bedingungen.

Obwohl die Verluste bei vollständiger Entsalzung beim Arginin über 36 % und beim Lysin über 18 % betragen, lassen sich auf zweidimensionalen Chromatogrammen mit bloßem Auge keine deutlichen Unterschiede zwischen in Ringerlösung aufgenommenen und anschließend entsalzten Aminosäuregemischen und solchen,

TABELLE 2

Durchschnittliche Verlustquoten verschiedener Aminosäuren nach elektrolytischer Entsalzung. Es wurden den freien Plasmaamino-säuren analoge Aminosäuregemische in Ringerlösung aufgenommen und 40 Minuten entsalzt. In Spalte 1 findet sich die eingewogene Menge der einzelnen Aminosäuren, in Spalte 2 die wiedergefundenen Mengen. Spalte 3 gibt die Verlustquote in % des Ausgangswertes (Mittel aus 5 Versuchen), Spalte 4 die Standardabweichung an.

Aminosäure	eingewogene Menge in $\mu\text{g/ml}$	wiedergefundene Mengen in $\mu\text{g/ml}$	Verlustquote in % (Mittelwert)	Standard- abweichung vom Mittel- wert in %
Alanin	25	23,5 - 23,9	6,2	$\pm$ 0,26
α -ABS	3	2,5 - 2,7	14,6	$\pm$ 0,78
Arginin	15	9,4 - 9,8	36,2	$\pm$ 0,36
Cystin	12	11,2 - 11,5	0,5	$\pm$ 0,46
Glutaminsäure	6	5,4 - 5,6	6,2	$\pm$ 0,26
Glutamin	60	58,5 - 59,2	3,3	$\pm$ 0,12
Glykokoll	12	11,3 - 11,6	4,0	$\pm$ 0,36
Histidin	10	9,3 - 9,5	6,5	$\pm$ 0,36
Isoleucin	9	8,1 - 8,4	8,2	$\pm$ 0,34
Leucin	16	13,5 - 13,8	14,3	$\pm$ 0,36
Lysin	12	9,5 - 9,9	18,5	$\pm$ 0,65
Methionin	5	4,6 - 4,8	3,5	$\pm$ 0,33
Ornithin	5	4,4 - 4,6	10,6	$\pm$ 0,4
Phenylalanin	9	8,0 - 8,3	8,3	$\pm$ 0,36
Prolin	20	18,5 - 18,9	6,5	$\pm$ 0,5
Serin	10	9,6 - 9,8	3,3	$\pm$ 0,17
Taurin	5	4,7 - 4,9	2,5	$\pm$ 0,2
Threonin	15	12,1 - 12,4	18,4	$\pm$ 0,42
Tryptophan	10	9,5 - 9,9	3,2	$\pm$ 0,36
Tyrosin	10	8,4 - 8,7	14,2	$\pm$ 0,36
Valin	25	21,4 - 21,7	13,6	$\pm$ 0,4

die von vorneherein in Aqua dest. aufgenommen wurden, wahrnehmen. Lediglich der Ornithinfleck erscheint auf manchen Chromatogrammen etwas vergrößert. Die Erklärung liegt darin, daß ein großer Teil des während der Entsalzung zu Verlust gehenden Arginins in Ornithin umgewandelt wird. ASTRUP, STAGE und OLSEN (1) und STEIN und MOORE (35) berichteten darüber. Bei den Plasmaamino-säureanalysen muß daher der Ornithinwert mit einem negativen Korrekturfaktor berichtigt werden. Die auf zweidimensionalen Chromatogrammen sichtbaren geringen Unterschiede sind uns ein wichtiger Hinweis für die Schwierigkeit, aus solchen Chromatogrammen allein durch Abschätzung der Fleckengröße und Intensität quantitative Angaben machen zu wollen.

Erst die lange Entsalzungsdauer von 40 Minuten garantiert eine vollständige Entsalzung. Sie war notwendig zur Erzielung einwandfreier Chromatogramme mit guter Trennung und ausreichender Schärfe der einzelnen Aminosäurebanden. Dies wird auch durch folgende Beobachtung demonstriert: Zu Beginn unserer eindimensionalen, chromatographischen Versuchsreihen mit dem Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch schienen die basischen Aminosäuren zu fehlen. Wir hatten zu diesen Versuchen 21 Aminosäuren eingewogen, in Ringerlösung aufgenommen und anschließend nur 20 Minuten elektrolytisch entsalzt. Bei zweidimensionaler, kombinierter elektropherographisch-chromatographischer Untersuchung, bei der ein geringer Salzgehalt nicht stört, konnten wir auch in diesen unvollständig entsalzten Aminosäuregemischen stets die basischen Aminosäuren als deutlich wahrnehmbare Flecken nachweisen. Sie mußten also vorhanden sein. Wenn sie bei eindimensionaler chromatographischer Untersuchung fehlten, zumindest nicht an identischer Stelle erschienen, so kann die Erklärung nur darin liegen, daß ihr R_f -Wert in salzhaltiger Lösung so verändert wird, daß wir sie nicht an der erwarteten Stelle auffanden. Weitere Versuche ergaben, daß der R_f -Wert erniedrigt wird und sich damit dem einiger neutraler Aminosäuren nähert. Dadurch laufen beide Aminosäuregruppen ineinander. So war bei unseren ersten Versuchen der Cystin-Gipfel bei der Auswertung mit dem Extinktionsmeßgerät sehr hoch. Die basischen Aminosäuren liefen nicht weiter als Cystin und bildeten mit diesem zusammen eine gemeinsame Bande.

Andere Aminosäuren können durch vorhandene Salzionen auch in ihrem Lauf beschleunigt werden (39), so z. B. Arginin, in geringerem Maße auch Glutamin und Glutaminsäure. Ihr R_f -Wert wird größer. Auch diese Aminosäuren erscheinen daher nicht an identischer Stelle wie die gleichen Aminosäuren der salzfreien Testlösungen.

Erst bei Einhaltung genügend langer Entsalzungszeiten (40 Minuten) erreichten wir, daß sich die Aminosäuren entsalzter Lösungen so wie solche salzfreier Lösungen verhielten.

E. Bestimmung der Plasmaamino-säuren:

Nach Klärung der geschilderten methodischen Vorfragen konnte das Verfahren zur Bestimmung der freien Plasmaamino-säuren angewendet werden. Neben einer großen Anzahl von Vorversuchen und unvollständigen Analysen, bei denen jeweils nur ein Teil der Plasmaamino-säuren bestimmt werden konnte, wurden 22 vollständige Analysen an 16 normalen, gesunden Versuchspersonen ausgeführt. Abbildung 3 zeigt einen Originalchromatographiestreifen der Plasmaamino-säuren einer unserer Versuchspersonen. Die Chromatographie erfolgte in dem Entwicklungsgemisch Isopropylalkohol : Eisessig : Wasser = 7 : 1,5 : 1,5. Der Streifen ist nicht retouchiert und in ganzer Länge und Breite photographiert. Man erkennt 11 deutlich getrennte Banden, die nur geringe Zonenimperfectionen aufweisen und die ganze Breite des Streifens gleichmäßig bedecken. (Die weißen Flecken in der am weitesten rechts gelegenen Bande 11 sind ein erst nach der Auswertung entstandenes Kunstprodukt.) Wir haben den Streifen nachträglich mit Kupfer nach BODE (2) behandelt, um ihn zur Aufbewahrung haltbar zu machen. Über dem Chromatographiestreifen finden sich die zugehörigen Extinktionskurven, die aus 11 gut auswertbaren Gaußkurven bestehen.

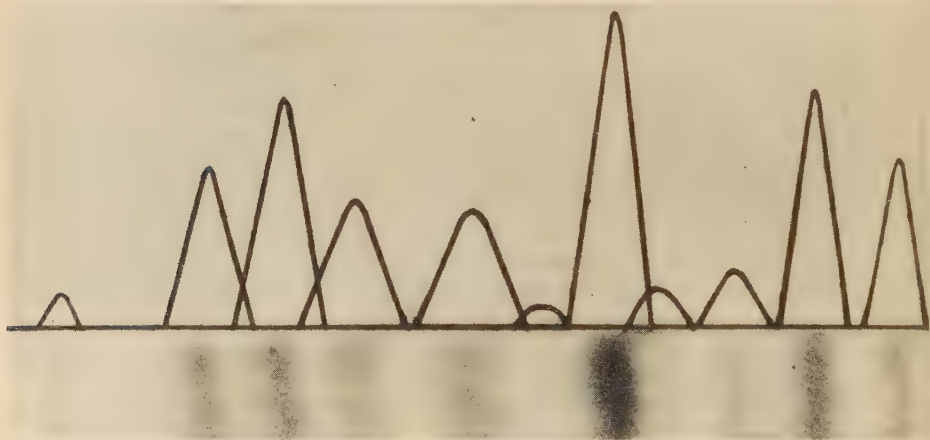


Abbildung 3: Originalchromatographiestreifen der Plasmaamino-säuren nach Chromatographie in Isopropylalkohol, Eisessig, Wasser (7:1,5:1,5). Färbung mit Ninhydrin, (später zur Haltbarmachung mit Kupfer besprüht). Darüber die zugehörigen Extinktionskurven, aufgenommen mit dem Elphor-Integraphen der Firma Bender und Hobein München.

Das Plasma wurde von einer Reihe von 16 gesunden, normalen Versuchspersonen gewonnen. Bei 2 Versuchspersonen wurde zur erneuten Überprüfung der Methodik eine Doppelbestimmung an zwei nacheinander getrennt entnommenen und getrennt aufgearbeiteten Blutproben ausgeführt. Bei 4 Versuchspersonen wurde einige Tage bis Monate nach der ersten Bestimmung erneut Blut entnommen und die Aminosäuren ein zweites Mal bestimmt. In Tabelle 3 finden sich die gefundenen Ergebnisse.

Bei den 2 Versuchspersonen, bei denen eine Doppelbestimmung an zwei zur gleichen Zeit entnommenen Blutproben ausgeführt wurde (Spalte 1 und 2), sind in der betreffenden Spalte jeweils zwei Werte eingetragen. Die Werte stimmen sehr gut überein, besonders wenn man bedenkt, daß alle sich summierenden kleinen Fehler des Gesamtverfahrens von der Enteiweißung und Entsalzung, dem mehrfachen Einengen und Umpipettieren bis zur Chromatographie und schließlichen Auswertung darin enthalten sind. Eine methodische Fehlerbreite von $\pm 3\%$ bis $\pm 6\%$ für die wichtigsten Aminosäuren konnte von uns bisher mit keinem anderen Verfahren erzielt werden.

Auch die Spalten 13 bis 16 enthalten zwei Werte. Bei diesen vier Personen wurden die Plasmaamino-säuren zweimal im Abstand von mehreren Tagen bis Monaten bestimmt.

Man ersieht aus der Tabelle, daß die freien Aminosäuren des nüchtern entnommenen Blutes zwischen gesunden normalen Menschen nur verhältnismäßig wenig schwanken. Ein Unterschied zwischen essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren läßt sich nicht ermitteln. Auch zeigen sich keine deutlichen Geschlechts- oder Altersunterschiede.

Mehrfache Bestimmung der Aminosäuren bei ein und demselben Menschen an verschiedenen Tagen ergibt für die meisten Aminosäuren einen sehr ähnlichen Wert (Spalte 13 bis 16). Das Spektrum der freien Aminosäuren von nüchtern entnommenem Plasma erweist sich damit als bemerkenswert konstant.

Eine noch weitgehendere Konstanz ergibt sich bei der Betrachtung des Gesamt-amino-Stickstoffes. Durch unser Verfahren werden alle wichtigen Aminosäuren des Blutplasmas erfaßt. Alle anderen, in Einzelfällen sonst nachgewiesenen Aminosäuren fallen mengenmäßig nicht ins Gewicht. Wir haben somit die Möglichkeit, aus den Molmengen der einzeln bestimmten Aminosäuren jeweils den Aminostickstoff zu berechnen, diesen zu addieren und damit eine Angabe über den Gesamt-amino-Stickstoff des Blutplasmas zu gewinnen. Die entsprechenden Werte bilden die letzte Zeile der Tabelle 3. Es ergibt sich die überraschende Tatsache, daß der Gesamtamino-Stickstoff bei sämtlichen 22 Bestimmungen einen sehr ähnlichen Wert hat. Die Standardabweichung beträgt nur etwa 4% vom Mittelwert. Dies bedeutet, daß der Gesamtamino-Stickstoff nur in sehr engen Grenzen schwanken kann, selbst wenn einzelne Aminosäuren um 100% oder mehr schwanken. Sind also

Aminosäure	W.M. ♀ 33 J.	H.R. ♀ 18 J.	A.P. ♀ 62 J.	A.E. ♀ 41 J.	B.L. ♀ 25 J.	H.L. ♀ 24 J.	F.M. ♀ 50 J.	F.S. ♂ 28 J.	L.F. ♂ 24 J.
Alanin	27,1 24,5	23,4 26,9	27,9	30,1	25,1	27,7	25,7	30,6	25,6
a-ABS	2,49 2,69	3,2 3,4	2,57	2,81	1,29	3,75	3,86	2,34	2,9
Arginin	12,3 11,2	9,4 10,5	8,9	10,5	8,7	12,1	11,6	10,3	10,5
Cystin	10,0 10,8	11,2 10,9	8,5	9,2	9,8	10,8	12,1	11,5	12,1
Glutamin	57,9 53,7	53,0 55,9	55,1	53,8	65,1	83,8	89,0	51,4	65,2
Glutaminsäure	6,75 6,1	7,3 6,7	6,2	5,9	4,8	2,9	4,9	7,2	6,2
Glykokoll	14,3 13,3	13,4 15,1	13,2	14,0	10,6	11,3	13,0	12,6	10,5
Histidin	12,9 11,8	11,3 10,6	9,5	7,6	9,3	7,4	8,2	13,5	12,3
Isoleucin	10,8 10,1	10,0 10,3	9,5	10,3	4,15	7,0	11,1	8,9	8,3
Leucin	17,6 18,2	17,9 18,5	17,1	17,2	14,2	15,2	20,4	15,4	17,6
Lysin	15,1 14,6	14,2 13,6	12,1	10,5	8,6	7,4	12,1	15,5	9,3
Methionin	5,18 4,2	4,56 4,0	4,56	4,35	3,62	4,2	3,62	3,9	4,2
Ornithin	1,9 2,4	2,2 2,3	3,1	1,7	1,5	2,6	1,8	2,8	2,2
Phenylalanin	10,8 9,5	9,9 10,1	10,1	9,7	7,6	10,1	8,1	10,0	8,0
Prolin	21,9 24,3	18,3 16,8	17,1	19,2	16,3	22,4	18,4	20,4	15,7
Serin	11,2 10,6	10,2 10,9	9,8	10,6	9,2	9,0	10,4	9,7	8,7
Taurin	5,9 5,2	4,9 5,1	5,3	5,9	4,6	4,7	4,5	5,2	5,2
Threonin	14,2 14,9	11,9 13,5	15,1	12,6	16,7	17,0	15,1	12,1	15,2
Tryptophan	7,4 8,2	6,5 7,2	7,2	6,8	10,1	15,1	14,8	6,9	8,3
Tyrosin	12,7 11,9	9,3 10,0	10,7	10,4	9,2	10,7	9,8	9,5	8,9
Valin	22,6 25,0	21,7 23,8	21,1	22,5	17,6	20,6	24,8	21,9	18,1
Gesamt-Amino-N in µg/ml	40,84 39,57	38,07 39,15	37,70	37,58	35,84	42,64	45,39	38,39	37,78

Tabelle 3: Übersicht über die gefundenen Aminosäurew.
Es wurden jeweils 21 verschiedene Aminosäuren quantitativ b
Einzelamino- säuren der freie Gesamtamino-N berechnet. Bei
wurden Doppelbestimmungen an nacheinander entnommenen
H.S., G.W., H.G. und A.S. wurden nach einigen Tagen bi

K.E. ♂ 23 J.	L.W. ♂ 24 J.	P.K. ♂ 23 J.	H.S. ♂ 24 J.	G.W. ♂ 56 J.	H.G. ♂ 52 J.	A.S. ♀ 18 J.	Schwankungs- breite	Mittelwert ± s
27,7	32,9	23,7	24,5 15,8	26,8 25,7	26,6 23,7	24,4 26,1	15,8 - 32,9	26,6 ± 3,3
1,71	1,76	2,7	1,6 2,46	1,76 2,16	2,1 2,8	2,9 2,7	1,29 - 3,86	2,55 ± 0,92
14,4	16,0	11,6	8,8 7,1	11,9 21,2	17,2 7,5	12,3 9,3	7,1 - 21,2	11,5 ± 3,4
14,9	11,2	19,8	63,2 53,2	17,1 11,2	10,5 10,1	9,2 9,1	7,2 - 19,8	11,1 ± 2,9
75,5	89,0	72,4	5,3 2,8	94,0 86,7	85,9 77,0	74,0 84,0	51,4 - 91,0	69,9 ± 14,6
4,1	3,5	4,7	10,2 9,6	4,26 4,35	5,2 3,6	5,6 5,6	3,5 - 7,0	5,2 ± 2,2
12,5	14,4	13,8	10,5 5,7	14,2 12,5	11,4 12,5	11,7 10,7	2,6 - 15,1	12,5 ± 0,74
10,3	8,5	8,7	6,6 6,5	7,7 9,4	12,6 8,6	7,7 7,3	5,7 - 13,5	9,6 ± 2,0
9,8	17,4	11,7	16,8 19,3	9,8 7,5	7,2 7,5	7,5 8,4	4,15 - 17,4	9,1 ± 2,6
16,6	14,9	25,0	14,2 6,4	15,8 16,2	16,3 14,8	14,8 16,6	14,3 - 25,0	17,1 ± 2,4
12,9	8,9	11,0	5,1 3,6	8,5 8,35	9,5 7,4	10,1 7,4	7,4 - 15,5	10,8 ± 2,7
2,8	3,2	3,9	3,2 1,5	2,8 3,1	2,6 3,0	3,5 3,1	2,8 - 5,18	3,8 ± 0,27
1,8	1,9	2,6	7,9 10,7	5,2 3,0	3,4 4,2	2,5 4,2	1,5 - 5,2	2,7 ± 0,95
7,2	7,7	8,9	16,8 18,2	9,75 6,4	7,3 7,1	8,95 8,4	6,4 - 10,8	8,8 ± 1,4
15,8	17,2	19,3	8,8 8,3	18,0 21,1	24,5 16,2	14,1 20,3	15,7 - 26,2	19,2 ± 3,1
8,8	9,3	12,2	4,9 7,1	8,9 8,6	7,9 7,8	8,5 8,9	7,8 - 12,2	9,5 ± 1,3
5,0	3,7	5,2	14,4 12,2	7,25 4,1	4,4 5,55	4,1 4,1	3,7 - 7,25	5,1 ± 0,82
17,2	11,0	16,8	6,9 11,6	15,1 12,7	15,7 12,8	11,5 15,3	11,0 - 17,2	14,2 ± 1,9
11,3	9,3	9,5	8,95 12,2	11,5 16,5	9,0 12,7	10,8 13,9	6,5 - 15,1	10,1 ± 3,1
14,8	10,5	15,3	6,9 11,6	12,4 17,0	14,3 11,1	8,25 11,6	8,25 - 17,0	11,3 ± 1,7
25,2	15,8	24,6	21,5 20,4	21,6 18,3	20,1 18,2	20,4 20,3	15,8 - 25,2	21,2 ± 2,6
42,82	43,53	42,69	37,37 32,34	45,97 43,51	43,69 38,37	38,27 41,67	32,34 - 45,97	40,49 ± 3,38

erte in µg/ml bei 16 gesunden Versuchspersonen.

estimmt, und aus den Amino-N-Werten aller
den ersten beiden Versuchspersonen W. M. und H. R.

Blutproben ausgeführt. Bei 4 Versuchspersonen

s Monaten Zweitbestimmungen ausgeführt.

bestimmte Aminosäuren bei einer Versuchsperson erhöht, dann sind gleichzeitig andere vermindert. Der Gesamtamino-Stickstoff wird dadurch von Versuchsperson zu Versuchsperson weitgehend konstant gehalten.

Besprechung der Ergebnisse:

In der Literatur (3, 4, 14, 16 - 20, 26, 29, 32 - 34, 36, 40) finden sich für die verschiedenen im Plasma hauptsächlich vorkommenden freien Aminosäuren folgende in Tabelle 4 zusammengefaßten Mengen als Normalwerte:

Die obere Zahl stellt den Mittelwert dar, darunter steht die jeweilige biologische Schwankungsbreite. Die durch die Methodik bedingte Fehlerbreite wird leider nicht in allen Arbeiten angegeben und mußte daher unberücksichtigt bleiben. Wie man aus der Tabelle ersehen kann, stimmen die Angaben für einige Aminosäuren gut überein, für andere schwanken sie beträchtlich, so für Asparagin, für Cystin, für Glutaminsäure, für Lysin und für einige andere. Manche Aminosäuren wie alpha-Amino-n-Buttersäure, Asparagin, Glutamin, Ornithin und Taurin wurden nur in zwei oder drei der vorliegenden Arbeiten gemeinsam mit den übrigen Aminosäuren bestimmt. Außer der Arbeit von STEIN und MOORE (36), die sich jedoch auf fünf Fälle beschränkt, wurden nur von uns 21 Aminosäuren gleichzeitig quantitativ bestimmt.

Unsere Werte stimmen mit den Angaben der Literatur gut überein und liegen für sämtliche Aminosäuren außer dem Ornithin im Rahmen der auch sonst berichteten Schwankungsbreite. Beim Ornithin liegen unsere Werte etwas tiefer als die sonst angegebenen. Es sind uns jedoch nur zwei Arbeiten von zusammen 20 Fällen bekannt, bei denen diese Aminosäure mitbestimmt wurde (26, 36). Unsere tatsächlich gefundenen Ornithinwerte lagen an sich ebenfalls höher und entsprachen etwa den Angaben der Literatur. Wir haben sie jedoch mit einem aus Vorversuchen mit Reinsubstanzen errechneten Korrekturfaktor reduziert, da wir sicher bei unserer Methode mit einem Übergang von Arginin in Ornithin während der Entsalzung rechnen mußten. Wie weit dies auch für andere Methoden zutrifft, wie weit also auch die beiden anderen in der Literatur angegebenen Werte zu hoch sind, ist schwer zu beurteilen, muß jedoch diskutiert werden.

Asparagin konnten wir im Gegensatz zu anderen Autoren nicht nachweisen, auch nicht qualitativ mit einem kombinierten hochspannungselektropherographisch-papierchromatographischen Verfahren. In der Literatur finden sich drei Arbeiten, in denen Asparagin zusammen mit anderen Aminosäuren bestimmt wurde (4, 20, 36). Die dort angegebenen Werte stimmen sehr wenig überein. Der von KELLEY und WAISMAN (20) gefundene Wert von 62 Mikrogramm/Milliliter ist kaum glaubhaft. Er dürfte entweder auf einem Mißverständnis oder auf einer Verwechslung mit einer anderen Aminosäure, wahrscheinlich dem Glutamin, beruhen. Auch die Angaben von CHRISTENSEN und Mitarbeitern (4) sind mit Reserve aufzunehmen.

Autor	Jahr	Methode	Zahl der Fälle	Alanin	α -ABS	Arginin	Asparagin	Asparagin- säure	Cystin- Cystein	Glutamin	Glutamin- säure	Glycin	Histidin
Hier (16)	1946	M	8	-	-	23 14 - 37	-	-	-	-	-	-	14 11 - 21
Sheffner (33)	1948	M	2	-	-	16,5 - 17,2	-	-	-	-	-	-	14,1 - 17,0
Steele (34)	1950	M	4	42	-	28	-	3	-	-	44	11	21
Hofstatter (17)	1950	M	23	-	-	-	-	-	-	-	-	12,6 8,7 - 14,6	13,5 10,2 - 17,7
Schreier (32)	1950	M	11	-	-	25,0 19,5 - 32,6	-	-	19,8 11,5 - 21,3	-	-	28,0	15,9 11,5 - 19,8
Johnson (19)	1951	M	24	-	-	16,2 10,0 - 27,0	-	-	14,7 8,2 - 20,0	-	-	-	13,8 9,5 - 19,0
Borden (3)	1952	M		-	-	15,0	-	-	-	-	-	-	14,2
Waisman (40)	1952	M	10	-	-	10,4	-	-	-	-	-	-	10,9
Harper (14)	1953	M	13	39,6 24 - 76	-	22,6 12 - 30	-	3,3 0 - 12	30,2 18 - 50	75,1 46 - 106	8,9 0 - 13	29,1 8 - 54	21,1 10 - 38
Stein (36)	1954	S	5	34,1 30,1 - 37,3	3,0 2,2 - 3,5	15,1 12,2 - 19,3	5,8 5,4 - 6,5	3,0 1,0 - 7,0	11,8 10,8 - 12,5	-	7,0 4,3 - 12,0	15,4 13,4 - 17,3	11,5 7,9 - 15,3
Huisman (13)	1954	M	2	-	-	14,0 8,5 - 20,0	-	2,0 1,5 - 2,5	-	-	8,3 7,0 - 12,0	16,0 14,0 - 18,0	27,0 24,0 - 29,0
Mc Menamy (26)	1957	P	15	28,5 17,8 - 40,1	2,3 1,3 - 3,0	11,9 8,7 - 16,7	-	-	-	64,0 45 - 111	2,95 0,0 - 3,7	17,7 10,5 - 21,8	13,7 9,3 - 17,0
Kelley (20)	1957	P	16	21 15 - 26	-	17 13 - 24	62 45 - 90	-	-	-	7 4 - 10	-	-
Christensen (4)	1957	S	3	21,0 18,7 - 23,5	2,6 1,6 - 3,6	10,5 7,7 - 12,5	27,9 22,6 - 34,6	1,4 1,2 - 1,5	-	-	5,2 4,0 - 6,3	31,9 21,0 - 43,8	10,8 9,1 - 13,0
Müting (29)	1958	P	30	33 28 - 41	-	14 9 - 22	-	10 6 - 15	10 8 - 12	-	24 11 - 38	13 5 - 20	19 13 - 31
Eigene Ergebnisse	1959	P	16	26,2 15,8 - 32,9	2,55 1,29 - 3,86	11,5 7,1 - 21,2	nicht nach- weisbar	Spuren	11,1 7,2 - 19,8	69,9 51,4 - 91,0	5,2 3,5 - 7,2	12,5 2,6 - 15,1	9,6 5,7 - 13,5

Tabelle 4: Übersicht über die wichtigsten bisher vorliegenden Bestimmungen der freien Plasmaamino-säuren in $\mu\text{g/ml}$. M = mikrobiologische Bestimmung, S = Ionenaustauscher-Säulenchromatographie und P = Papierchromatographie. Wenn möglich wurde jeweils in der oberen Zeile der Mittelwert, in der unteren Zeile die Schwankungsbreite der Werte angegeben.

Leucin	Leucin	Lysin	Methionin	Ornithin	Phenylalanin	Prolin	Serin	Taurin	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin
17	20	30	-	-	14	-	-	-	21	-	-	29
- 23	16 - 28	20 - 37	-	-	9 - 21	-	-	-	13 - 32	-	-	25 - 37
18,0	25,0	20,8 - 24,7	3,2 - 4,5	-	-	-	-	-	20,8 - 21,6	-	-	22,3 - 26,7
18	24	37	9	-	19	28	-	-	31	17	13	34
13,6	19,1	28,9	-	-	-	-	-	-	18,5	11,7	13,9	29,2
5 - 16,5	12,3 - 23,1	18,3 - 40,2	-	-	-	-	-	-	12,0 - 27,4	6,9 - 15,0	10,5 - 19,5	19,5 - 34,8
15,2	20,3	28,3	2,9	-	15,6	-	11,6	-	20,7	10,0	14,3	30,5
3 - 22,6	16,8 - 24,7	21,0 - 34,2	1,5 - 5,1	-	12,7 - 17,3	-	9,8 - 16,0	-	16,1 - 25,8	7,2 - 14,0	10,6 - 17,3	24,6 - 36,5
13,4	18,6	21,9	5,2	-	9,9	-	-	-	16,7	12,7	10,4	27,2
0 - 20,0	15,0 - 23,0	13,0 - 30,0	3,6 - 6,6	-	7,3 - 13,0	-	-	-	12,0 - 22,0	7,1 - 17,0	6,2 - 14,0	22,0 - 34,0
-	-	26,1	-	-	10,9	29,4	-	-	13,4	-	9,8	-
7,1	15,1	24,1	3,6	-	7,1	-	-	-	14,1	7,8	9,3	23,7
20,0	24,8	36,8	5,7	-	19,9	26,1	13,9	-	20,6	17,4	13,2	32,0
- 42	10 - 52	23 - 58	2,5 - 10,0	-	11 - 40	15 - 57	3 - 20	-	9 - 36	9 - 30	9 - 24	25 - 42
8,9	16,9	27,2	3,8	7,2	8,4	23,6	11,2	5,5	15,9	-	10,3	28,8
9 - 12,8	14,2 - 23,0	25,1 - 30,2	3,3 - 4,3	6,2 - 8,0	6,9 - 9,5	18,4 - 33,3	10,1 - 12,5	4,1 - 8,2	12,1 - 17,2	-	8,1 - 14,5	23,7 - 37,1
7,1	16,5	14,0	4,2	-	8,6	15,0	-	-	9,8	-	-	25,0
2 - 10,0	7,8 - 24,0	12,0 - 17,0	2,0 - 6,4	-	6,6 - 10,0	13,0 - 18,0	-	-	7,5 - 11,0	-	-	20 - 30
6,55	10,4	20,9	4,2	7,7	9,2	16,4	8,9	1,2	16,1	4,3	12,7	14,9
0 - 10,0	6,6 - 14,1	15,4 - 27,8	1,5 - 6,7	6,1 - 9,9	5,5 - 12,4	11,5 - 20,8	-	0,0 - 2,5	11,9 - 20,4	2,9 - 5,3	5,9 - 16,3	9,4 - 18,8
-	-	-	-	-	8	17	10	-	12	6	11	19
7,4	13,2	20,4	3,4	-	6 - 10	11 - 30	7 - 13	-	9 - 18	4 - 12	9 - 15	13 - 33
8 - 7,9	10,7 - 14,6	17,5 - 21,6	3,1 - 3,7	-	7,9	20,1	15,4	5,2	15,7	-	7,7	-
7	25	19	8	-	7,7 - 8,0	19,6 - 20,6	13,9 - 17,2	3,9 - 7,2	12,7 - 18,5	-	7,1 - 8,6	-
- 10	10 - 42	9 - 30	5 - 11	-	14	20	21	-	11	15	11	32
9,1	17,1	10,8	3,8	2,7	8 - 24	13 - 29	15 - 29	-	6 - 15	10 - 35	7 - 21	26 - 42
5 - 17,4	14,3 - 25,0	7,4 - 15,5	2,8 - 5,18	1,5 - 5,2	8,8	19,2	9,5	5,1	14,2	10,1	11,3	21,2
					6,4 - 10,8	15,7 - 26,2	7,8 - 12,2	3,7 - 7,25	11,0 - 17,0	6,5 - 15,1	8,25 - 17,0	15,8 - 25,2

Bei der von ihnen verwendeten Methode läßt sich nämlich Asparagin nicht von Glutamin trennen (36). Auf Angaben über diese Aminosäure wurde jedoch verzichtet. Es ist daher möglich, daß irrtümlich Glutamin bestimmt wurde, zumal auch der Wert von CHRISTENSEN mit 27 Mikrogramm/Milliliter so hoch liegt, daß das Vorkommen einer solchen Menge sicher auch anderen Untersuchern aufgefallen wäre.

Die leider sich auf fünf Fälle beschränkende Angabe von STEIN und MOORE (36) wurde dagegen mit exakter Methodik gewonnen. Die Autoren haben als einzige die bei einmaliger Säulenchromatographie an Dowex 50 x 8 nicht trennbaren Aminosäuren Glutamin und Asparagin nach der Chromatographie aufgefangen, erneut chromatographiert und dadurch getrennt. Unsere Befunde lassen sich in diesem Punkt nicht mit den Angaben dieser Autoren zur Deckung bringen.

Asparaginsäure wurde im Gegensatz zu Asparagin von uns stets nachgewiesen. Ihre Menge war jedoch so gering, daß wir auf quantitative Angaben verzichteten. Die sehr geringen Asparaginsäuremengen sprechen dagegen, daß das von uns nicht nachgewiesene Asparagin durch unser methodisches Vorgehen vielleicht in Asparaginsäure umgewandelt wird. Wäre dies der Fall, und sind die von STEIN und MOORE angegebenen Werte als zutreffend anzunehmen, hätten wir unter allen Umständen Asparaginsäure vermehrt finden müssen.

Die gefundene biologische Schwankungsbreite von Mensch zu Mensch - jeweils gesunde normale Versuchspersonen vorausgesetzt - ist für die meisten Aminosäuren bemerkenswert gering. Unsere Werte stimmen auch hier mit den Angaben der übrigen Literatur gut überein. Für einen solchen Vergleich stehen allerdings erst wenige Arbeiten zur Verfügung, da die Versuchsserien der meisten in unserer Tabelle angeführten Arbeiten zu klein sind. Darüber hinaus ist oft schwierig zu sagen, wie weit die jeweilige methodische Fehlerbreite mit für die berichteten Schwankungen verantwortlich ist. Exakte Angaben darüber und Doppelbestimmungen am selben Plasma fehlen bei einigen angeführten Arbeiten. Meist wurden nur Teilschritte der Methodik überprüft.

Eine weitgehende Konstanz des Aminosäurespektrums bei ein und derselben Versuchsperson auch bei unterschiedlicher Diät und Untersuchungen über einen längeren Zeitraum wurde in der Literatur verschiedentlich behauptet (32, 34). Wir konnten nur bei vier Versuchspersonen eine Zweitbestimmung nach einigen Tagen bis Monaten durchführen. Das Ergebnis dieser Versuche ist nicht ganz einheitlich. Die Schwankungen sind für manche Aminosäuren deutlich geringer als die Schwankungen zwischen den Werten zweier verschiedener Versuchspersonen. Für andere Aminosäuren läßt sich diese Tendenz jedoch nicht nachweisen. Natürlich sind vier Untersuchungen nicht ausreichend, um genauere Angaben über die mögliche Konstanz des Aminosäurespektrums bei Untersuchungen über einen längeren Zeitraum machen

zu können. Bei solchen Untersuchungen wäre auch der Einfluß weiterer Faktoren wie einer extrem unterschiedlichen Diät oder der Einfluß von Hormonen und Medikamenten auf das Aminosäurespektrum zu überprüfen. Solche physiologisch und pharmakologisch höchst interessanten Untersuchungen wurden mit exakter Methodik bisher nur für einzelne Aminosäuren und den Gesamtamino-Stickstoff unternommen. Auch fehlen bisher Untersuchungen darüber, wie weit ein bestimmtes Spektrum der Plasmaamino-säuren über Generationen hinweg erblich determiniert ist, und in welchen Grenzen es sich durch äußere Einflüsse modifizieren läßt.

Solche Arbeiten wurden leider bisher durch den großen methodischen Aufwand erschwert, der die Analyse nur sehr begrenzter Versuchsserien erlaubte. Neuere Verfahren, wie das von uns angewandte, sind jedoch auch für den Kliniker ohne allzugroße Schwierigkeiten durchführbar. Sie lassen daher für die Zukunft wesentlich tiefere Einblicke in den Aminosäurestoffwechsel erwarten.

Unser Verfahren hat dazu den Vorteil, daß praktisch alle wichtigen im Plasma vorkommenden Aminosäuren erfaßt werden. Daher ist hier im Gegensatz zu früheren Verfahren, wie beispielsweise den mikrobiologischen, die Möglichkeit gegeben, außer den Einzelamino-säuren auch den freien Gesamtamino-Stickstoff des Plasmas rechnerisch mit großer Genauigkeit zu bestimmen. Wir fanden als wichtigstes Ergebnis eine ganz überraschende Übereinstimmung zwischen den Gesamtamino-Stickstoff-Werten unserer verschiedenen Versuchspersonen. Die Standardabweichung für den Gesamtamino-Stickstoff des nüchtern entnommenen Plasmas verschiedener Versuchspersonen ist geringer als die irgendeiner individuellen Aminosäure und liegt noch innerhalb der Fehlerbreite unserer Methode. Die Erhöhung des Spiegels bestimmter Aminosäuren im Plasma muß daher mit der Erniedrigung anderer Aminosäuren einhergehen. Nur so kann der Gesamtamino-Stickstoff gleich bleiben. Ein Blick in unsere Tabelle 3 zeigt, daß dies eindeutig der Fall ist. Die Personen H.R., A.P., A.E., F.S., L.F. und A. S. haben praktisch den gleichen Gesamtamino-Stickstoffwert, obwohl die Werte für die einzelnen Aminosäuren um über 50 % schwanken. Unterschiede im Spektrum der verschiedenen Aminosäuren wirken sich also nicht auf den Gesamtamino-Stickstoff aus.

Die wichtige und interessante Frage, ob im Körper der Spiegel jeder einzelnen Aminosäure oder nur der Gesamtamino-Stickstoff oder aber beides - vielleicht mit unterschiedlicher Präzision - durch einen Regelmechanismus konstant gehalten wird, kann durch solche Untersuchungen einer Lösung näher gebracht werden. Die geringe Anzahl unserer Fälle gestattet uns leider nicht, diese Frage schon jetzt eindeutig zu beantworten. Immerhin spricht die bemerkenswerte Tatsache, daß von allen Werten diejenigen für den Gesamtamino-Stickstoff am wenigsten schwanken, dafür, daß der Gesamtamino-Stickstoffspiegel im Körper am strengsten reguliert wird. Durch weitere Untersuchungen müßte geklärt werden, wie

sich die Werte für den Gesamtamino-Stickstoff und diejenigen für sämtliche einzelne Aminosäuren verhalten, wenn durch pathologische Mechanismen oder durch künstliche Zufuhr von außen der Spiegel einer oder mehrerer Aminosäuren einseitig verändert und so der angenommene Regelmechanismus aus dem Gleichgewicht gebracht wird.

Ein Vergleich des von uns aus den Einzelamino-säuren errechneten Gesamtamino-Stickstoffes mit den Werten der Literatur ist aufschlußreich. Gilt die von uns festgestellte weitgehende Konstanz des Aminostickstoffes im Nüchternplasma gesunder Versuchspersonen nämlich allgemein, unabhängig von Geschlecht, Rasse, Ernährung usw., dann müssen die Werte, die verschiedene Autoren zu verschiedenen Zeiten mit unterschiedlicher Methodik gewonnen haben, ebenfalls sehr nahe beieinander liegen. Dies ist tatsächlich in überraschender Weise der Fall. Die genaueste Bestimmung des Gesamtamino-Stickstoffes stammt von HAMILTON und van SLYKE (13). Außerdem wurde ähnlich unserem Vorgehen von STEIN und MOORE der Gesamtamino-Stickstoff aus den Einzelamino-säuren errechnet. RUBINSTEIN und PRYCE bestimmten den Gesamtamino-Stickstoff mit Hilfe eines colorimetrischen Verfahrens (31). Unser Mittelwert von 40,1 Mikrogramm/Milliliter stimmt tatsächlich mit den Werten von STEIN und MOORE (40,2 Mikrogramm/Milliliter), von HAMILTON und van SLYKE (41 Mikrogramm/Milliliter) und von RUBINSTEIN und PRYCE (45,4 Mikrogramm/Milliliter) sehr genau überein. Sämtliche Angaben fallen noch in die Schwankung unserer Werte.

Abschließend sollen noch die methodischen Vorteile des von uns benutzten Verfahrens für die Klinik kurz diskutiert werden. Wir sehen den Hauptvorteil unseres Vorgehens darin, daß im Verhältnis zur erreichten großen Genauigkeit nur sehr geringe Mittel benötigt werden, vorausgesetzt, daß ein Gerät zur direkten Extinktionsmessung zur Verfügung steht. Wir selbst hatten Gelegenheit, sowohl den Elphor-Integraphen der Firma Bender und Hobein (Modell 1958), als auch den Zeiss-Extinktionsschreiber II zur Auswertung unserer Streifen zu benutzen. Grundsätzlich sind beide Geräte geeignet. Ersteres Gerät schrieb jedoch eine besser stabilisierte Basislinie und lieferte höhere und daher besser auswertbare Extinktionskurven. Außerdem war die Schwankungsbreite bei mehrmaliger Messung derselben Streifen geringer. Wir gaben ihm daher den Vorzug.

Der Zeitaufwand für eine komplette Bestimmung sämtlicher Blutaminosäuren beträgt bei automatischer Auswertung der Streifen und Chromatographie in drei verschiedenen Lösungsmitteln einschließlich Blutentnahme, Enteiweißen, Entsalzen und Vorbereiten der jeweils mitzuchromatographierenden Vergleichslösungen höchstens fünf bis sechs Arbeitsstunden. Die Fehlerbreite des geschilderten Verfahrens mit durchschnittlich $\pm 5\%$ für sämtliche Arbeitsgänge, auch für die in geringer Konzentration vorliegenden Aminosäuren, ist für die meisten klinischen Fragestellungen ausreichend.

GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL (9), die das Verfahren in der von uns benutzten Form entwickelt haben, konnten damit sogar eine Fehlerbreite von nur 3 % erreichen. Wahrscheinlich sind zwei Gründe für unsere etwas höhere Fehlerbreite verantwortlich:

Erstens stellen biologische Flüssigkeiten wie Blutserum oder Harn komplexere Gemische dar als die von den Autoren bestimmten Hydrolysate reiner Eiweißkörper. Die methodischen Schwierigkeiten sind daher stets größer, welches Verfahren auch verwandt wird.

Zweitens konnten GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL eine Vortrennung der Aminosäuregemische durch ihre präparative Elektrophoreseapparatur herbeiführen (12). Dadurch waren einmal in den zur papierchromatographischen Trennung aufgetragenen Gemischen meist nur noch wenige Aminosäuren vorhanden, zum anderen erübrigte sich die mit unvermeidbaren Aminosäureverlusten und Aminosäureumwandlungen verbundene Entsalzung nach CONSDEN, GORDON und MARTIN (5). Dies ist ein ganz erheblicher Vorteil, denn die Entsalzung war bei uns das schwächste Glied in der Kette der notwendigen Arbeitsgänge und erforderte die Einhaltung sehr gleichmäßiger Bedingungen von Versuch zu Versuch. Nur dann kann mit reproduzierbaren und daher kompensierbaren Fehlern gerechnet werden.

Die drei in der Einleitung an die Methodik gestellten Forderungen: Genügende Genauigkeit bei tragbarem Zeitaufwand, Bestimmbarkeit möglichst aller Aminosäuren gleichzeitig und Durchführbarkeit mit in jeder Klinik vorhandenen Hilfsmitteln werden also weitgehend erfüllt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei 16 gesunden normalen Versuchspersonen wurden 21 freie Aminosäuren des Blutplasmas nebeneinander quantitativ bestimmt. Das sind alle wichtigen überhaupt vorkommenden Aminosäuren. Es konnte daher aus den Mengen der Einzelaminosäuren auch jeweils der Gesamtamino-Stickstoff des Blutplasmas berechnet werden. Bei vier Versuchspersonen wurde eine zweite Bestimmung im Abstand von einigen Tagen bis Monaten durchgeführt.
2. Es wird gezeigt, daß die Schwankungsbreite für die verschiedenen Aminosäuren von Versuchsperson zu Versuchsperson gering ist und etwa der Schwankungsbreite anderer physiologisch vorkommender Substanzen entspricht. Das Aminosäurespektrum ein und derselben Versuchsperson erweist sich bei mehrmaliger Untersuchung als ziemlich konstant. Darüber hinaus ergibt sich für den Gesamtamino-Stickstoff ein fast identischer Wert für sämtliche Versuchs-

personen. Unterschiede im Aminosäurespektrum wirken sich also nicht auf den Gesamtamino-Stickstoff aus. Dieser scheint von allen Komponenten die am strengsten regulierte Größe zu sein.

3. Die gefundenen Werte für die einzelnen Aminosäuren und den Gesamtamino-Stickstoff werden mit den bisher vorliegenden Arbeiten der Literatur verglichen und eine weitgehende Übereinstimmung festgestellt.
4. Die verwendete papierchromatographische Methodik wird eingehend dargestellt, andere Verfahren diskutiert. Die Vorteile des beschriebenen Verfahrens für die Klinik werden besprochen.
5. Alle Teilschritte der Methodik werden einer genauen Prüfung hinsichtlich ihrer Fehlerbreite unterzogen. Insbesondere wird gezeigt, daß bei der Entsalzung nach CONSDEN, GORDON und MARTIN mit konstanten Verlusten gerechnet werden kann, wenn stets unter gleichen Bedingungen gearbeitet wird.

Herrn Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit gab, an seiner Klinik meine Dissertation durchzuführen.

Herrn Professor Dr. H. ZICKGRAF und Herrn Dr. H. G. KNAUFF möchte ich für ihre Hilfe bei der Wahl des Themas und ihre Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation danken.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Astrup, T., A. Stage und E. Olsen:
A desalting apparatus for amino acids.
Act. chem. Scand. 5, 1343, 1941
2. Bode, F.:
Eine Vereinfachung und Verbesserung der Methode
zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und
Peptonen mittels des Ninhydrin-Kupferkomplexes.
Biochem. Z. 328, 433, 1955
3. Borden, Al. L., E. C. Brodie, E. B. Wallraff, W. P. Holbrook,
D. F. Will, C. A. L. Stephens jr., R. B. Johnson u. A. R. Kemmerer:
Amino acid studies and clinical findings in normal
adults and rheumatic arthritis patients treated with ACTH.
J. clin. Invest. 31, 375, 1952
4. Christensen, P. J., J. W. Date, F. Schonheyder und K. Volquartz:
Amino acids in blood plasma and urine during
pregnancy.
Scan. J. clin. & lab. Invest. 9, 54 1957
5. Consden, R., A. H. Gordon und A. J. P. Martin:
The identification of lower peptides in complex
mixtures.
Biochem. J. 41, 590, 1947
6. Dose, K. und A. Caputo:
Die Anwendung der Hochspannungspherographie bei der
quantitativen Totalanalyse von Proteinhydrolysaten.
(Untersuchungen am Lysozym)
Biochem. Z. 328, 376, 1956
7. Dose, K.:
Die Anwendung der Hochspannungspherographie bei der
quantitativen Totalanalyse von Proteinhydrolysaten.
II. Mitteilung.
Bioch. Z. 329, 416, 1957
8. Fischer, G. u. H. Dörfel:
Zur quantitativen Auswertung der Papierchromato-
gramme von Eiweißhydrolysaten.
Biochem. Z. 324, 544, 1953

9. Grassmann, W., K. Hannig und M. Plöckl:
Eine Methode der quantitativen Bestimmung der
Aminosäurezusammensetzung von Eiweißhydrolysaten
durch Kombination von Elektrophorese und Chroma-
tographie.
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chem. 299, 258, 1955
10. Grassmann, W., K. Hannig und M. Knedel:
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung
der Serumproteine auf Filtrierpapier.
Dtsch. med. Wschr. 76, 333, 1951
11. Grassmann, W. und K. Hannig:
Beiträge zur Methodik der papierelektrophoretischen
Serumanalyse.
Klin. Wschr. 32, 838, 1954
12. Grassmann, W. und K. Hannig:
Trennung von Stoffgemischen auf Filtrierpapier
durch Ablenkung im elektrischen Feld.
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chem. 292, 32, 1953
13. Hamilton, P. B. und D. D. van Slyke:
The determination of free amino acids in blood
filtrates by the ninhydrin-carbon dioxide method.
J. biol. chem. 150, 231, 1943
14. Harper, H. A., M. E. Hutchin und J. R. Kimmel:
Concentration of nineteen amino acids in plasma and
urine of normal fasting males.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 80, 768, 1953
15. Heilmeyer, L., R. Clotten, I. Sano, A. Sturm jr. und A. Lippe:
Analyse des Reststickstoffes mit Hilfe des Hoch-
spannungspherogramms. (Eine neue analytische Me-
thode)
Klin. Wschr. 32, 831, 1954
16. Hier, W. H. und O. Bergeim:
The microbiological determination of certain free
amino acids in human and dog plasma.
J. biol. chem. 163, 129, 1946

17. Hofstatter, L., P. G. Ackermann und W. B. Kountz:
The plasma levels of nine free amino acids in
old men and women.
J. lab. & clin. med. 36, 259, 1950
18. Huisman, T. H.: The concentration of different amino acids in
the blood plasma in children suffering from
rickets and scurvy.
Pediatrics 14, 245, 1954
19. Johnson, C. A. und O. Bergeim:
The distribution of free amino acids between
erythrocytes and plasma in man.
J. biol. chem. 188, 833, 1951
20. Kelley, J. J. und H. A. Waisman:
Quantitative plasma amino acid values in
leucemic blood.
Blood. J. Hematology 12, 635, 1957
21. Kickhöfen, B. u. O. Westphal:
Trennung der Aminosäuren- und Peptidgemische
durch Hochspannungs-Papierionophorese.
Z. Naturforsch. 7 b, 655, 1953
22. Kirsner, J. B., A. L. Sheffner, W. L. Palmer:
Studies on amino acid excretion in man.
J. clin. Invest. 28, 716, 1949
23. Knauff, H. G., W. Mialkowsky und H. Zickgraf:
Über die freien Aminosäuren des Liquor
cerebrospinalis und ihren Nachweis mit kombinierten
papierchromatographischen und elektropherographi-
schen Methoden.
Z. klin. Med. 155, 438, 1959
24. Knauff, H. G. und H. Zickgraf:
Über das Vorkommen von freiem Aethanolamin
(Colamin) im Liquor cerebrospinalis des Menschen.
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chem. 312, 264, 1958
25. Kofranyi, E.: Über quantitative Papierchromatographie von
Aminosäuren in Proteinhydrolysaten.
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chem. 299, 129, 1955

26. McMenamy, R. H., C. C. Lund und J. L. Oncley:
Unbound amino acid concentrations in human
blood plasma.
J. clin. Invest. 36, 1672, 1957
27. Moore, S. u. W. H. Stein:
Chromatographie in amino acids on sulfonated
polystyrene resins.
J. biol. chem. 192, 663, 1951
28. Moore, S. u. W. H. Stein:
Procedures for the chromatographic determination
of amino acids on four per cent crosslinked
sulfonated polystyrene resins.
J. biol. chem. 211, 813, 1954
29. Müting, D.:
Der Aminosäurehaushalt des Menschen.
Arzneimittelforschung 8. Beiheft, S. 79.
Aulendorf, Württ. 1958
30. Röwe, K., E. Ferber u. H. Fischer:
Quantitative Bestimmung von Aminosäuren aus
hochspannungselektrophoretisch getrennten Ge-
mischen durch automatische Extinktionsschreibung.
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chem. 313, 174, 1958
31. Rubinstein, H. M. u. J. D. Pryce:
The colorimetric estimation of alpha-amino
nitrogen in tissue fluids.
J. clin. pathol. 12, 80, 1959
32. Schreier, K. u. H. Plückthun:
Untersuchungen über den Gehalt an freien Amino-
säuren im Serum und Urin.
Biochem. Z. 320, 447, 1950
33. Sheffner, A. L., J. B. Kirsner u. W. L. Palmer:
Studies on amino acid excretion in man.
I. Amino acids in urine.
J. biol. chem. 175, 107, 1948
34. Steele, B., M. S. Reynolds und C. A. Baumann:
Amino acids in the blood and urine of human
subjects ingesting different amounts of the same
proteins.
Nutrition 40, 145, 1950

35. Stein, W. H. u. S. Moore:
Electrolytic desalting of amino acids.
Conversion of arginine to ornithin.
J. biol. chem. 190, 103, 1951
36. Stein, W. H. u. S. Moore:
The free amino acids of human blood plasma.
J. biol. chem. 211, 915, 1954
37. Strobel, R.:
Zur Konstitution des Insulins und chromatographische
methodische Entwicklungen.
Inaug.-Dissertation München 1957
38. Turba, F.:
Chromatographische Methoden in der
Proteinchemie.
Springerverlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
1954, S. 96
39. Turba, F.:
Chromatographische Methoden in der
Proteinchemie.
Springerverlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
1954, S. 251
40. Waisman, H. A., R. A. Pastel und H. G. Poucher:
Amino acid metabolism in patients with
acute leukemia.
Pediatrics 10, 653, 1952

LÉBENSLAUF

Am 8. März 1935 wurde ich, Peter Dieterle, als zweites der sechs Kinder von Dr. Karl Dieterle, Facharzt für Innere Medizin, und Anna Elisabeth D., geborene May, in Leisnig/Sachsen geboren.

Von 1941 bis 1947 besuchte ich in Leisnig die Volksschule. Nach der Übersiedlung nach Kreuth am Tegernsee im Herbst 1947 war ich bis 1954 Schüler am Gymnasium mit Oberrealschule Tegernsee, wo ich im Juli 1954 das Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1954 immatrikulierte ich mich an der Münchener Universität zum Medizinstudium. Bis 1960 war ich ununterbrochen an der Universität München und bestand im Frühjahr 1957 das Physikum, im Frühjahr 1960 das Staatsexamen.

